



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 15/13, C12P 21/08	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/20799 (43) 国際公開日 1992年11月26日(26. 11. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00650 (22) 国際出願日 1992年5月21日(21. 05. 92) (30) 優先権データ 特願平3/145218 1991年5月22日(22. 05. 91) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 萩原義秀(HAGIWARA, Yoshihide)[JP/JP] 〒665 兵庫県宝塚市平井山荘4番14号 Hyogo, (JP) (71) 出願人; および (72) 発明者 萩原秀昭(HAGIWARA, Hideaki)[JP/JP] 〒665 兵庫県宝塚市平井山荘4番14号 Hyogo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 青塚康幸(AOTSUKA, Yasuyuki)[JP/JP] 〒651-22 兵庫県神戸市西区月が丘5丁目1番地の4 1-517 Hyogo, (JP) (74) 代理人 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.) 〒107 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AT(欧州特許), AU, BE(欧州特許), CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), HU, IT(欧州特許), KR, NL(欧州特許), RU, SE(欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : AMINO ACID SEQUENCE OF ANTICANCER HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY AND DNA BASE SEQUENCE CODING FOR THE SAME (54) 発明の名称 抗癌ヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列及びそれをコードするDNA塩基配列 (57) Abstract <p>Amino acid sequences of the heavy chain and light chain variable regions of the cancer cell antigen specific human immunoglobulin CLN-IgG produced by the human/human fused cell line CLN/SUZ H11 composed of the B cell of a patient with uterine cancer and a human lymphoblast cell line; and base sequences of the genes thereof. These amino acid and base sequences are useful in the medical and pharmaceutical fields for the prevention, treatment and diagnosis of human diseases and in the pharmacological and biochemical fields as biochemical reagents and reagents for purifying biopolymers.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

ヒト子宮癌患者のB細胞とヒトリンパ芽球細胞株とのヒト/ヒト融合細胞株CLN/SUZ H11が産生する癌細胞抗原特異的ヒト免疫グロブリンCLN-IgGの重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列及びその遺伝子の塩基配列。上記アミノ酸配列及び塩基配列は、ヒトの疾患の予防、治療、診断などの医学及び薬学分野や、生化学的試薬、生体高分子の精製試薬などの薬理学、生化学分野などにおいて有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
AU	オーストラリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
BB	バルバドス	GA	ガボン	MW	マラウイ
BE	ベルギー	GN	ギニア	NL	オランダ
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BR	ブラジル	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SD	スーダン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CH	スイス	KR	大韓民国	SN	セネガル
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トogo
DE	ドイツ	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DK	デンマーク	MG	マダガスカル	US	米国
ES	スペイン	ML	マリ		

明 細 書

抗癌ヒトモノクローナル抗体のアミノ酸配列及びそれをコードする
DNA塩基配列

5 技術分野

本発明は、たとえば、ヒトの疾患の予防、治療、診断などの医学及び
薬学分野や、生化学的試薬、生体高分子の精製試薬などの薬理学、生化学
学分野などの広い分野において有用な抗原特異的ヒト免疫グロブリンの
可変領域の構造に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト子宮癌患者
10 のB細胞とヒトリンパ芽球細胞株とのヒト／ヒト融合細胞株CLN／S
UZ H11が産生する癌細胞抗原特異的ヒト免疫グロブリンの重鎖及
び軽鎖可変領域のアミノ酸配列ならびにその遺伝子の塩基配列に関する。

背景技術

細胞融合あるいは細胞の不死化によるモノクローナル抗体作成の技術
15 の開発以来、多くの有用な抗体が主にマウスなどをつかって得られてき
た。そのなかでも悪性腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体は、腫瘍抗
原の解析等の基礎研究への利用のほかに、血清診断、標識化抗体による
腫瘍の画像診断などに利用されはじめ、その利用価値はきわめて高い。
しかし、マウス等の異種抗体はヒトにとって異物であり、ヒトに頻回投
20 与することは投与抗体に対する免疫反応を惹起し、その結果、副作用並
びに抗体の治療または予防効果の低下を引き起こす。以上の点から、ヒ
トの癌の予防、治療、体内診断など、実際に抗体をヒトに投与する臨床
分野を考えると、ヒト型の抗体を用いることが望ましい。しかし、ヒト
型のモノクローナル抗体は、その作成が困難であることから、現在のと

ころほとんど実用に供されていない。

このような状況の中で本発明者の一人は、特開昭58-201994号公報（特公平01-59878号公報）、特開昭59-135898号公報および特開昭59-137497号公報に詳しく開示されているごとく、ヒト癌細胞に高い反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株CLN/SUZ H11（ATCC No. HB8307）を樹立した。この細胞株が産生する抗体（CLN-IgGと命名）は、抗体クラスがIgG、アイソタイプが γ 1型および κ 型であり、免疫組織学的に癌細胞の表面に存在する癌抗原に結合し、なおかつ癌細胞の増殖を抑制する効果をもつという興味ある知見が得られている。

このような技術背景の中で、以下に述べる如き解決すべき課題がある。

1) モノクローナル抗体産生細胞株は、一般に継代と共にその抗体産性能の低下することが知られている。また一般的に言って、ヒトハイブリドーマはマウスのそれと比較して抗体の産生量が低い。ヒトモノクローナル抗体を癌治療や診断に用いる場合、大量の抗体が必要であり、この問題の解決は必須である。

2) 現在の免疫学の知見によれば、モノクローナル抗体がヒト癌細胞に結合し、抗体それ自体の作用で癌細胞の増殖を抑制し、あるいは癌細胞を死滅させる機構が知られている。更にはまた、補体もしくはK-細胞やマクロファージなどの助けを借りて癌細胞の増殖を抑制し、癌細胞の死滅を引き起こすことが知られている。しかし、これらの効果は実際のところ期待されるほど強力ではなく、それゆえ更に抗体の抗癌活性を上昇させる試みが必要である。

以上のような課題の解決手段、すなわち抗体産生量の改善と抗体の抗

癌活性の上昇を具体化するひとつの手段として遺伝子操作による方法がある。例えば上記1)の問題の場合、抗体遺伝子をクローニングした後、動物細胞や大腸菌などの宿主細胞に遺伝子を導入し、抗体遺伝子を発現させ、抗体を多量に得る方法によって解決することが考えられ、また上記2)の問題の場合、抗体遺伝子を人為的に換えることによって、抗体の種々の機能、たとえば抗原との結合親和性や、免疫担当細胞を介した抗癌活性あるいは組織浸潤性を上昇させるように改変したり、さらには本来抗体が持たない機能、たとえば細胞毒性、酵素活性、免疫誘導活性などを抗体分子もしくはその断片に付加することで、より抗癌活性の高い分子をデザインすることが考えられる。

これらの目的を達成するためには、抗体遺伝子の分離さらに構造の解明が重要である。しかしながら、該CLN-IgGモノクローナル抗体を構成する軽鎖と重鎖の構造、さらには抗原と特異的に結合する機能を有する可変領域の遺伝子構造についてはこれまで全く知られていない。

そこで本発明の主たる目的は、該CLN-IgGモノクローナル抗体の軽鎖と重鎖の遺伝子構造を解明することにある。

発明の開示

本発明者らは、該CLN-IgGモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖をコードするcDNAを分離し、該DNA塩基配列を解明し、またその配列より該抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列を決定し本発明を完成するに至った。

具体的には、CLN/SUZ H11よりmRNAを調製し、そこから作成したcDNAラムダファージ・ライブラリーを、プラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングし、単離したファージクロー

ンの挿入DNAの塩基配列を決定することにより達成された。以下本発明について更に詳細に説明する。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトκ鎖サブグループ1に属する24の可変領域配列の Kab
at & Wu plotを示す。

図2は、ヒト重鎖サブグループ3に属する21の可変領域配列の Kab
at & Wu plotを示す。

発明の詳細な記述

本発明によれば、CLN-IgGモノクローナル抗体軽鎖可変領域お
よび重鎖可変領域のDNA塩基配列は、PCR法（ポリメラーゼ鎖反応
法）により増幅したヒト抗体遺伝子断片をプローブとして、CLN-I
gGモノクローナル抗体軽鎖および重鎖のcDNAをクローニングし、該
DNA塩基配列を解析することにより決定される。以下、これらの工程
について更に詳細に説明する。

[1] mRNA単離精製

本発明において使用される細胞株は、ヒト子宮癌患者リンパ球とヒト
リンパ芽球を融合させたヒト/ヒトハイブリドーマであり、具体的には
特開昭58-201994号公報（特公平01-59878号公報）に
詳しく開示され、ヒト脳腫瘍、肺ガン、胃ガン、悪性黒色腫などのごと
き癌細胞の細胞表面抗原に特異的に反応するヒト型モノクローナル抗体
を産生するハイブリドーマCLN-SUZ H11である。このハイブ
リドーマはATCC（American Type Culture Collection）に登録
番号HB8307として登録されている。

この細胞を適当な条件下、例えば温度37℃、炭酸ガス濃度5%の条

件下、5%牛胎児血清を含む培養液、たとえばRDF培地中で培養増殖させ、得られる細胞を遠心分離によって集めた後、細胞から常法、例えばHanらのグアニジウムチオシアネート法 [Han, J. H., Stratowa, C., & Rutter, W. J. (1987) Biochemistry, 26, 1617-1625] により全RNAを抽出し、ついでこれを常法、例えばオリゴdTセルロースを用いる吸着カラムクロマトグラフィまたはバッチ法によりポリ(A)⁺RNA画分を分離精製する。

得られるポリ(A)⁺RNAはさらにcDNAライブラリーの作製に利用することができる。本発明においては、具体的にはCLN-SUZH11ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出し、この抽出物からオリゴdTセルロースカラムを用いてポリ(A)⁺RNAを精製し、以下のcDNAライブラリーの作製に供した。

[2] cDNAライブラリーの作製

[1]の工程で得られるポリ(A)⁺RNAを鋳型とし、ポリAに対応するオリゴdT、あるいは抗体の定常領域に対応すると考えられる塩基配列を有する合成ヌクレオチドをプライマーとして、dATP、dGTP、dTTP、dCTPの存在下で逆転写酵素によりmRNAと相補的な一本鎖DNAを合成する。次いで大腸菌RNA分解酵素HでRNAを断片化した後、この一本鎖DNAを鋳型として、大腸菌DNAポリメラーゼIを用いて二本鎖cDNAを合成する。こうして得られるcDNAに、例えばEcoRIリンカーを連結後、EcoRI消化することによって粘着末端を導入することができる。得られる断片を適当なファージベクター、例えばλgt10ベクター、λgt11ベクターなどのEcoRI部位に連結した後、インビトロパッケージングを行い、cDNAライブラリーを

作製することができる。

本発明の具体的操作においては、[1]の工程で得られるポリ(A)⁺RNAを鋳型としcDNAを合成し、このcDNAをλgt10ベクターに連結しcDNAライブラリーを作製した。

5 [3] プロープの作製

プロープとしては、ヒト免疫グロブリン軽鎖又は重鎖の定常領域あるいは可変領域の遺伝子もしくはその断片、あるいはその部分のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成したものを、たとえばニックトランスレーション法により³²P、ビオチンなどで標識を行ったものを用いることができる。

10

本発明において好適には、cDNAを鋳型に、抗体の軽鎖および重鎖の一部に相当する配列をプライマーにして行ったPCRにより増幅された断片を、ニックトランスレーション法によりビオチン化したものをプロープとすることができる。

15

[4] cDNAのクローニング

20

[2]の工程で得られるcDNAライブラリーを、[3]の工程で得られるプロープを用いることにより目的とするクローンの選択を行う。例えば[2]の工程で得られるcDNAライブラリーのλgt10ファージを大腸菌株(C600Hfl⁻)に感染させることでプラークを形成させ、さらにプラークハイブリダイゼーション法によって陽性クローンを選別する。これにより、CLN-IgG重鎖cDNAクローンとしてλCLN-G111が、CLN-IgG軽鎖cDNAクローンとしてλCLN-K411が選択され塩基配列決定に供された。

[5] 塩基配列の決定

〔４〕の工程で得られるcDNAクローンは、たとえばpUC18のようなプラスミッドベクターやM13ファージなどのファージベクターあるいはpUC118、pBluescript SK⁺などのファージミッドベクターに再クローン化し、得られるサブクローンの挿入部分のDNA塩基配列をマキシム、ギルバート法やサンガー法を用いて塩基配列を決定することができる。

本発明の具体的操作においては、〔４〕の工程で得られるλCLN-G111およびλCLN-K411のEcoRI断片を、pBluescript SK⁺に再クローン化後、ヘルパーファージR408感染により一本鎖DNAを調製し、サンガー法によりその塩基配列を決定した。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例

実施例1：ハイブリドーマCLN/SUZ H11からのmRNA（ポリ(A)⁺RNA）の単離精製

ヒトヒトハイブリドーマCLN/SUZ H11からmRNA分画を得た方法は以下のとおりである。

CLN/SUZ H11細胞から、グアニジウムチオシアネート法 [Han, J. H., Stratowa, C., & Rutter, W. J. (1987). Biochemistry, 26, 1617-1625] により、全RNAを調整した。培養細胞10⁹個を遠心分離で集め生理食塩水で洗浄する。800 rpmで遠心し集めた細胞の沈殿に、あらかじめ氷冷しておいた8% 2-メルカプトエタノールを含む5Mグアニジウムチオシアネートを20 ml加え、すみやかにホモジェナイズする。その細胞破碎液を、あらかじめ7.5 mlのエタノールを入れ-20℃に冷やしておいたポリプロ

ピレン遠心チューブに入れて混合し、即座に10,000 rpmで5分間遠心する。得られた沈殿にあらかじめ氷冷しておいた8% 2-メルカプトエタノールを含む5 Mグアニジウムチオシアネートを10 ml 加えホモジェナイズした後、そこへ1 M酢酸0.25 ml と7.5 ml の冷エタノールを加え、-20℃で一晩放置する。10,000 rpmで10分間遠心分離し得られた沈殿を10 mM 2-メルカプトエタノールを含む6 M塩酸グアニジン10 ml に溶解し、さらに1 M酢酸0.25 ml と5 ml の冷エタノールを加え-20℃で3時間放置する。10,000 rpmで10分間遠心分離し得られた沈殿を6 M塩酸グアニジン5 ml に溶解し1 M酢酸0.125 ml と2.5 ml の冷エタノールを加え-20℃でさらに3時間放置する。10,000 rpmで10分間遠心分離し得られた沈殿を滅菌純水5 ml に溶解し、2 M酢酸ナトリウム0.5 ml および冷エタノール12.5 ml 加え-20℃で全RNA分画として保存する。

ポリ(A)⁺RNAは、上述の方法で得られた全RNA分画から Chirgwinの方法 [Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., & Rutter, W. J. (1979) Biochemistry, 18, 5294-5299] を用いて調製した。まずCLN/SUZ H11細胞の全RNA 9 mgを純水に解かし2.5 mg/ml とする。100℃で5分間熱処理し、氷上で急冷した後、5 M塩化リチウム、10% SDS、1 Mトリエタノールアミン塩酸pH 7.4をそれぞれ最終濃度0.5 M、0.2%、10 mMになるように加える。その溶液を、あらかじめ結合緩衝液(0.5 M塩化リチウム、0.2% SDS、10 mMトリエタノールアミン塩酸、pH 7.4)で平衡化しておいたオリゴ(dT)セルロースカラムにかける。さらにカラム体積の10倍の結合緩衝液で洗浄す

る。カラムに結合したポリ (A) +RNA を溶出緩衝液 (10 mM トリエタノールアミン塩酸、pH 7.4) で溶出し、RNA 分画を集める。得られたポリ (A) +RNA 溶液は 100℃ で 5 分間熱処理した後、上述のオリゴ (dT) セルロースカラムを用いたクロマトグラフィーを新しいカラムをつかってもう一度繰り返す。RNA は、溶出液に 2.5 倍量のエタノールと 1/10 量の 2 M 酢酸ナトリウムを加え、10,000 × g の遠心分離した後の沈殿として回収する。精製ポリ (A) +RNA 沈殿を滅菌純水に溶解し 2 μg/μl の濃度で -70℃ で保存する。

実施例 2 : CLN/SUZ H11 ライブラリーの作成

実施例 1 で得られたポリ (A) +RNA 4 μg を用い、アマシャム社の cDNA 合成キットのプロトコールに従い、cDNA を合成し 3.2 μg 回収した。この cDNA 断片を EcoR I メチラーゼ処理後、EcoR I リンカーを T4 DNA ligase を用いて連結した。EcoR I 消化後、アマシャム社製カラムにより EcoR I 末端を有する cDNA 分画を回収した。この cDNA 100 ng を λgt10 ベクター (ストラタジーン社製) 1 μg に連結後、in vitro パッケージングをパッケージングキット (GIGA PACK GOLD ; ストラタジーン社製) を用いて行い CLN/SUZ H11 cDNA ライブラリー 7.8×10^6 pfu/μg DNA を作成した。

実施例 3 : プロテインシーケンサーによる CLN-IgG のアミノ酸配列の決定

精製 CLN-IgG を還元後、ゲルろ過により精製した重鎖および軽鎖のそれぞれ 30 μg をプロテインシーケンサー 477A (アプライトバイオシステムズ社製) につけ、N 末端からのアミノ酸配列を約 30 残

基決定した。また重鎖を臭化シアンによりメチオニン特異的に切断し断片を逆相液体クロマトグラフィーで分離精製後、同様に一部のアミノ酸配列を決定した。

実施例 4 : プローブの作成法

(1) 重鎖のプローブ

実施例 3 で決定した CLN-IgG 重鎖の部分アミノ酸配列とホモロジーをもつ配列を NBRF 蛋白質データベース (NBRF-PDB; National Biomedical Research Foundation Protein Data Base) から検索した結果、ヒト免疫グロブリン germ line VH26 (エントリ一名 H3HU26、Accession number A02047) が最も高いホモロジーを持つことが明らかとなった。そこで EMBL DNA データベース (EMBL-GDB; European Molecular Biology Laboratory Gene data Base) にある VH26 の DNA 配列 (ID 名 HSI GH AU, Accession number M17747) のうちから N 末端アミノ酸 10 残基に相当する 30 ヌクレオチド (プライマー No. 1) を合成した。また重鎖 γ 1 CH1 ドメインの DNA 配列 (EMBL-GDB; ID 名 HSI GCC 4, Accession number J00228) の C 末端側アミノ酸 10 残基に相当する 30 ヌクレオチド (プライマー No. 2) を合成した。

合成 DNA (プライマー No. 1)

5'-GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGC-3'

合成 DNA (プライマー No. 2)

5'-AACTTTCTTGTCCACCTTGGTGTGCTGGG-3'

この 2 種類のプライマーを用いて実施例 2 で調製した CLN/SUZ H11 cDNA 4 ng をテンプレートに PCR (ポリメラーゼ鎖反応) を

行った。その結果、約660塩基対の断片（PCR γ C3）が増幅され、塩基配列決定により抗体重鎖 γ 1-CH1ドメインおよび可変領域に相当することがあきらかとなった。この γ C3をニックトランスレーションの方法でビオチン化しプローブ（ビオチン化PCR γ C3）を得た。

5 (2) 軽鎖のプローブ

実施例3で決定したCLN-IgG軽鎖の部分アミノ酸配列とホモロジーをもつ配列をNBRF蛋白質データベースから検索した結果、Daudi細胞由来のヒト免疫グロブリン（エントリー名K1HUI、Accession number A01884）の配列と最も高いホモロジーがあった。そこでEMBL DNAデータベースにあるDaudi抗体軽鎖のDNA配列（ID名HSV K02, Accession number X00966）のうちからN末端アミノ酸10残基に相当する30ヌクレオチド（プライマーNo. 3）を合成した。また軽鎖（ κ 鎖）CドメインのDNA配列（EMBL-GDB; ID名HSIGK1, Accession number V00557）のC末端側アミノ酸10残基に相当する30ヌクレオチド（プライマーNo. 4）を合成した。

合成DNA（プライマーNo. 3）

5'-GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC-3'

合成DNA（プライマーNo. 4）

5'-CTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGT-3'

この2種類のプライマーを用いて実施例2で調製したCLN/SUZH11cDNA 4ngをテンプレートにPCRを行った。その結果、約660塩基対の断片（PCR κ A4）が増幅され、塩基配列決定により抗体軽鎖（ κ 鎖）Cドメインおよび可変領域に相当することが明らかとなった。このPCR κ 4をニックトランスレーションの方法でビオチン

化しプローブ（ビオチン化PCR κ A4）を得た。

実施例5：cDNAのクローニング

（1）重鎖cDNAのクローニング

前記実施例2で得られたCLN/SUZ H11cDNAライブラリ
5 ーに対して実施例4で得られたビオチン化プローブを用いてブランクハ
イブリダイゼーションを行い13個の陽性クローンを得た。この中のク
ローンのひとは約1.6K塩基対の挿入DNAを持っており、このフ
ァージを λ CLN-G111と命名した。

（2）軽鎖cDNAのクローニング

10 前記実施例2で得られたCLN/SUZ H11cDNAライブラリ
ーに対して実施例4で得られたビオチン化プローブを用いてブランクハ
イブリダイゼーションを行い27個の陽性クローンを得た。この中のク
ローン411は約1.0K塩基対の挿入DNAを持っており、このフ
ァージを λ CLN-K411と命名した。

15 実施例6：塩基配列の決定

実施例5においてクローン化した λ CLN-G111および λ CLN
-K411のEcoRI断片をファージミッドBluescript SK⁺に再ク
ローン化した。このファージミッドで形質転換した大腸菌XL1-Blue
にヘルパーファージR408を感染させ、一本鎖DNAを調整し、サン
20 ガー法 [Sanger, F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
74:5463 (1977)] により塩基配列を決定した。その結果得
られたCLN-IgG軽鎖cDNAクローンの可変領域の塩基配列および
それから予測されるアミノ酸配列を以下に示す。

第1表: C L N - I g G 重鎖(γ)可變領域斷片

AGC	CCA	GCC	CTG	GGA	TTT	TCA	GGT	GTT	TTC	ATT	TGG	TGA	TCA	GGA	CTG	AAC	AGA	GAA	CTC
-19																			
ACC	ATG	GAC	TTT	GGG	CTG	AGC	TGG	CTT	TTT	CTT	CTG	GCT	ATT	TTA	AAA	GGT	GTC	CAG	TGT
Met Asp Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val Gln Cys																			
-10																			
1																			
GAG	GTG	CAG	CTG	TTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GAC	TTG	GTA	CAG	CCT	GGG	GGG	TCG	CTG	AGA	CTC
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ser Leu Arg Leu																			
30																			
TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGC	AAC	TAT	GCC	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala																			
50																			
CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTC	TCA	GCG	ATT	ACT	CCT	AGT	GGT	GGT	AGT	ACA	AAT	TAT
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Ser Thr Asn Tyr																			
70																			
GCA	GAC	TCC	CTG	AAG	GGC	CGG	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	CAG	AAT	ACA	CTG	TAT
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr																			
90																			
CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GTC	GAG	GAC	ACG	GCC	GTA	TAT	TAC	TGT	GGG	AGA	GTC	CCA
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Val Pro																			
110																			
TAT	AGA	AGC	ACT	TGG	TAC	CCT	TTA	TAT	TGG	GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA
Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp Gly Gln Thr Leu Val Thr Val Ser Ser																			

GCC

Ala

第2表: CLN-1g 輕鎖(κ)可變領域斷片

GGA ATT CCG TCA GGA CAC AGC

-20	-10	-1
ATG GAC ATG AGA GTC CTC GCT AGG CTC CTG GGG CTC TGT GCT CTG TCC CAG TGC AGA TGT		
Met Asp Met Arg Val Leu Ala Arg Leu Leu Gly Leu Cys Ala Leu Ser Gln Cys Arg Cys		
1	10	20
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr		
	30	40
ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG CAG AAA CCA		
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro		
	50	60
GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAC AGG AAG GTC CCA ACA		
Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Arg Lys Val Pro Thr		
	70	80
CAA TTC AGC GGC AGT GCA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT		
Gln Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	90	100
GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA CAG TAT ATG ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Met Thr Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gly		
GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA		
Gly Thr Lys Lys Val Glu Ile Lys Arg		

また、CLN-IgG重鎖および軽鎖のサブグループを決定するためコンピューター検索を行い相同性の高い遺伝子を調べた結果、CLN-IgG重鎖可変領域はサブグループ3に、まだ軽鎖(κ 鎖)可変領域はサブグループ1に属することが明かとなった。

5 実施例7：超可変領域の決定

種々の抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を各々比較すると、配列が一定の領域(定常領域)と異なっている領域(可変領域)が存在することがわかる。可変領域の中でも特に変異性に富んでいるところを超可変領域(hyper-variable region, Hv領域)と呼び、重鎖及び軽鎖それぞれ3箇所ずつ存在する。アミノ末端から、それぞれHv1、Hv2、Hv3と呼ぶ。これらの超可変領域は抗原との結合部位を形づくり、抗原決定基と直接接触するアミノ酸残基を含んでいると考えられている。そのため超可変領域は、相補性決定領域(CDR; Complementarity determining region)とも呼ばれ、抗体の抗原特異性を支配している領域である。

CLN-IgGの超可変領域を決定するためにKabat & Wuプロットを用いた。[Kabat, E. A., Wu, T. T., Bilofsky, H. Variable Regions of Immunoglobulin Chains (Medical Comput. Systems, Bolt, Beranek & Newman, Cambridge, 1976)]これは種々の抗体の配列を並べて、各位置ごとに変異度を計算してプロットするものである。ここでいう変異度とは、「任意の位置における出現アミノ酸の種類数」と「その位置で最も頻繁に出現するアミノ酸の頻度」の比であり、理論的に1から400の値をとる。変異度の値が大きい領域が超可変領域である。

(1) CLN-IgG軽鎖の超可変領域の決定

CLN-IgG軽鎖のアミノ酸配列から、カッパ鎖サブグループ1に属することが明かとなった。そこでNBRF-PDB (rel. 26) に含まれているサブグループ1に属する24の配列をCLN-IgG軽鎖と共に並べ、各位置で変異度を計算しKabat & Wuプロットを作製した(図1)。その結果から、Hv1、Hv2、Hv3をそれぞれ残基番号28から34、50から56、91から96と決定した。

CLN-IgG軽鎖の超可変領域

Hv1 : Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

Hv2 : Ala Ala Ser Ser Leu His Arg

Hv3 : Tyr Met Thr Tyr Pro Ile

(2) CLN-IgG重鎖の超可変領域の決定

CLN-IgG重鎖のアミノ酸配列から、Hvサブグループ3に属することが明かとなった。そこでNBRF-PDB (rel. 26) に含まれているサブグループ3に属する21の配列をCLN-IgG重鎖と共に並べ、各位置で変異度を計算しKabat & Wuプロットを作製した(図2、残基番号96まで表示)。その結果、Hv1、Hv2をそれぞれ残基番号31から35、49から59と決定した。Hv3に関しては、重鎖の場合、下記第3表に示すごとく、各配列間で顕著に鎖長が異なるため位置を正確にあわせることが困難である。ギャップを考慮せずに変異度を計算すると、残基番号96システインが1.0、97グリシンが2.1、98アルギニンが3.9、99バリンが29.3、109チロシンが18.4、110トリプトファンが3.5、111グリシンが1.0となる。明かに残基番号99から109までの位置で変異度が高く、この領域がH

v 3に相当する。

CLN-IgG重鎖の超可変領域

H v 1 : Asn Tyr Ala Met Ser

H v 2 : Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn

H v 3 : Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr

5

第 3 表

	Kol	CARDGGHGFCS	SASCF	GP	DYWG	QGTP	VT	VSS
	Bro	CARSPVSLVD	GWLY	YYYG	SVWG	QGT	L	
	Cam	CAR----	DRPLYG	DYRA	FNYWG	QGT	LV	TVSS
10	Tro	CAA----	TDDFD	WSTF	SLDY	WGEG	DL	TVSS
	Tei	CAR----	VTPAA	ASLT	FSAV	WGQ	GT	LV
	Pom	CAR----	DAGPY	VSPT	FFAH	YGQ	GT	LV
	Ga	CAR----	SGIAL	GSV	AGTD	YWGE	GT	LV
	Lay	CAR----	DAGPY	VSPT	FFAH	WGQ	GT	LV
	Hil	CAR-----	DPDIL	TAFS	FDYWG	QGVL	LV	TVSS
			99		109			
15	CLN	CGR-----	VPYR	STWY	PLY	WGQ	GT	LV
	Dob	CAK-----	GYI	WNG	NWFD	SWG	QGT	LV
	Was	CAR-----	FRQ	PFV	QFFD	VFG	QGT	LV
	Bur	CAK-----	LI	AVAG	-TRD	FWG	QGT	LV
	Tur	CAR-----	LS	VT	AVAF	DVWG	QGT	KV
	Til	CAK-----	GK	VS	AYYF	DYWG	EGT	LV
	Zap	CAR-----	TR	PGGY	FSDV	WGQ	GT	LV
	Nie	CAR-----	IR	D	TAMF	FAHW	QGT	LV
20	Jon	CAR-----	VVV	ST	SMDV	WGQ	GT	PV
	Gal	CAR-----	GW	GGG	DYWG	QGT	LV	TV
	But	CAR-----	DL	AA	RLFG	KGTT	VT	TV
	WEA	CAR-----	GW	LL	NWG	QGT	LV	TV

産業上の利用可能性

CLN-IgG抗体及びその遺伝子構造が明かになったことによって、この遺伝子を動物細胞や大腸菌などの宿主細胞に導入し発現させ、抗体を多量に得ることが可能となる。更には完全抗体のみならず、ある種の抗体断片、たとえば重鎖のみ、軽鎖のみ、Fab断片、F(ab)'₂断片、Fv断片、ドメイン断片(dAb)、CDR断片などの各種抗体由来断片を得ることが可能となる。また更に抗体遺伝子に人為的突然変異を起こすことにより、アミノ酸配列の一部異なる完全抗体もしくは各種抗体由来断片を得ることができる。

現在までの研究の結果、CLN-IgGは、たとえばヒト胃ガン、肺ガン、脳腫瘍、悪性黒色腫などのごときヒト癌細胞に働き、それ自体の作用でこれら癌細胞の増殖を抑制し、或は癌細胞を死滅させ、さらには補体もしくはK-細胞やマクロファージなどの助けを借りて癌細胞の増殖を抑制し、癌細胞の死滅を引き起こすことが期待される。しかし、CLN-IgGの遺伝子を改変し抗体のアミノ酸を一部置換することにより、更に抗体の活性を上昇させることが可能である。たとえば抗原との結合親和性や、免疫担当細胞を介した抗癌活性、あるいは組織への浸潤性などが上昇するように改変できる。さらには、たとえば細胞毒性、酵素活性、免疫誘導活性などを抗体分子もしくはその断片に遺伝子レベルで付加する毒性、酵素活性、免疫誘導活性などを抗体分子もしくはその断片に遺伝子レベルで付加することで、より抗癌活性の高い分子をデザインすることが考えられる。具体例を挙げれば、癌特異的抗体をキャリアーとして利用して、例えば化学療法剤結合-ヒトモノクローナル抗体、インターフェロン結合-ヒトモノクローナル抗体、高分子毒素結合-ヒ

トモノクローナル抗体、薬物入りリポソーム結合ーヒトモノクローナル抗体、などの形で癌細胞の増殖抑制や死滅を誘導する薬剤として有用である。また、抗体に放射線感受性物質を結合させて患者に投与し、癌細胞に選択的に集積させ、治療、診断の効果を上げることも考えられる。

5 このような癌に対する利用に際しては、ヒトモノクローナル抗体として完全な抗体を用いてもよいし、前述したとおり、例えば重鎖のみ、軽鎖のみ、Fab断片、F(ab)'₂断片、Fv断片、ドメイン断片(dAb)、CDR断片などの特異的抗原認識部位を含むより小さな断片を用いることもできる。

10

15

20

請 求 の 範 囲

1. 下記のアミノ酸配列

H v 1 : Asn Tyr Ala Met Ser

H v 2 : Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn

H v 3 : Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr

を有する超可変領域H.v.1、H.v.2及びH.v.3から選ばれる少なくとも1つの
超可変領域を含むことを特徴とする免疫グロブリン重鎖可変領域断片。

2. 下記のアミノ酸配列

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp¹⁰Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu²⁰Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser³⁰Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala⁴⁰Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala⁵⁰Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr⁶⁰Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile⁷⁰Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr⁸⁰Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp⁹⁰Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Val Pro¹⁰⁰Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp¹¹⁰Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹²⁰

Ala

を有する免疫グロブリン重鎖可変領域断片。

3. 下記のアミノ酸配列

H v 1 : Asn Tyr Ala Met Ser

H v 2 : Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn

H v 3 : Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr

を有する超可変領域H.v1、H.v2及びH.v3から選ばれる少なくとも1つの超可変領域をコードする塩基配列を含むことを特徴とする免疫グロブリン重鎖可変領域の少なくとも一部をコードするDNA及びRNA断片。

4. 請求の範囲第2項記載のアミノ酸配列をコードするDNA及びRNA塩基配列。

5. 下記の塩基配列

```

      10      20      30      40      50      60
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTACAGCCTGGGGGGTCGCTGAGACTC
      70      80      90     100     110     120
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGCAACTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT
      130     140     150     160     170     180
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCGATTACTCCTAGTGGTGGTAGTACAAATTAT
      190     200     210     220     230     240
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCCAGAATACACTGTAT
      250     260     270     280     290     300
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGGGAGAGTCCCA
      310     320     330     340     350     360
TATAGAAGCACTTGGTACCCTTTATATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
GCC
```

を有する請求の範囲第4項記載のDNA塩基配列及びこれに対応するRNA塩基配列。

6. 下記のアミノ酸配列

H v 1 : Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

H v 2 : Ala Ala Ser Ser Leu His Arg

H v 3 : Tyr Met Thr Tyr Pro Ile

を有する超可変領域H.v1、H.v2及びH.v3から選ばれる少なくとも1つの超可変領域を含むことを特徴とする免疫グロブリン軽鎖可変領域断片。

7. 下記のアミノ酸配列

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser 10
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr 20
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser 30
 Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro 40
 Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala 50
 Ala Ser Ser Leu His Arg Lys Val Pro Thr 60
 Gln Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp 70
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln 90
 Tyr Met Thr Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gly 100
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

を有する免疫グロブリン軽鎖可変領域断片。

8. 下記のアミノ酸配列

H v 1 : Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

H v 2 : Ala Ala Ser Ser Leu His Arg

H v 3 : Thr Met Thr Tyr Pro Ile

を有する超可変領域H.v.1、H.v.2及びH.v.3から選ばれる少なくとも1つの
 超可変領域をコードする塩基配列を含むことを特徴とする免疫グロブリン
 軽鎖可変領域の少なくとも一部をコードするDNA及びRNA断片。

9. 請求の範囲第7項記載のアミノ酸配列をコードするDNA及び
 RNA塩基配列。

10. 下記の塩基配列

10 20 30 40 50 60
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 70 80 90 100 110 120
 ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGACATTAGTAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCA
 130 140 150 160 170 180
 GGGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCACAGGAAGGTCCCAACA
 190 200 210 220 230 240
 CAATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
 250 260 270 280 290 300
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCTACAGTATATGACTTACCCTATCACCTTCGGCGGA
 310 320
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

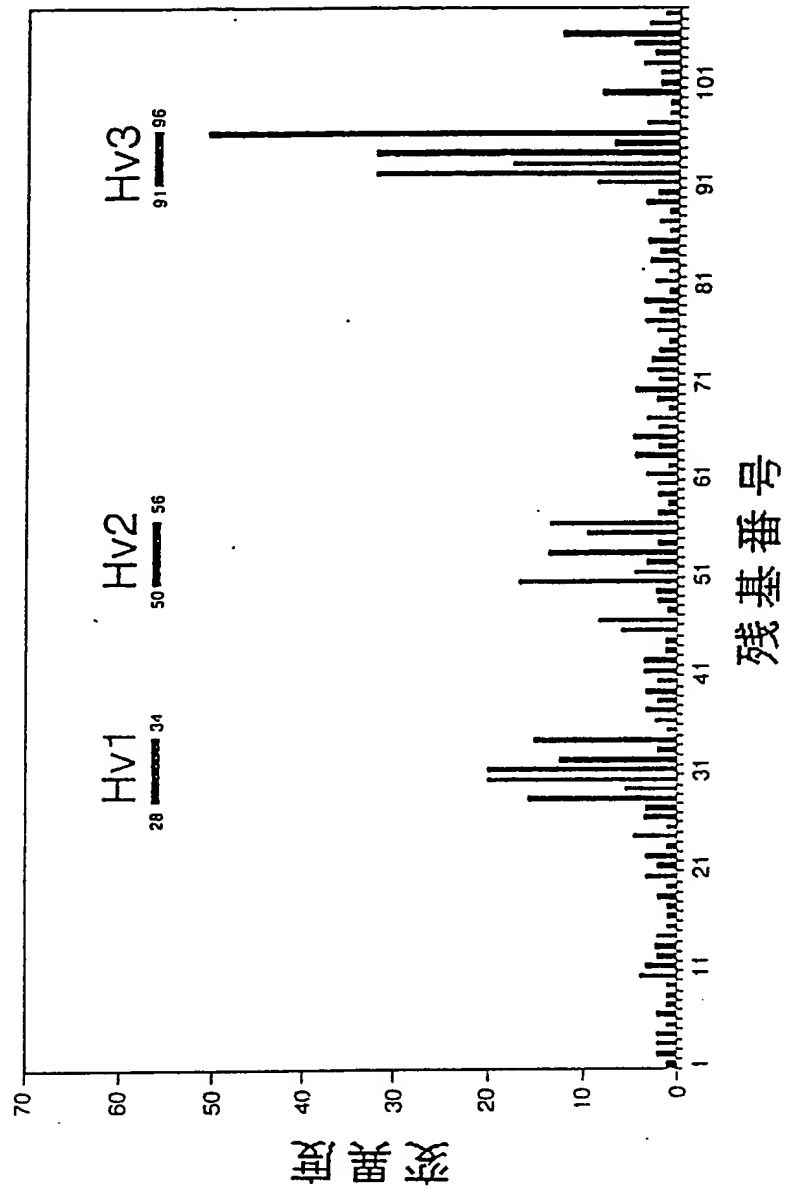
を有する請求の範囲第9項記載のDNA塩基配列及びこれに対応するRNA塩基配列。

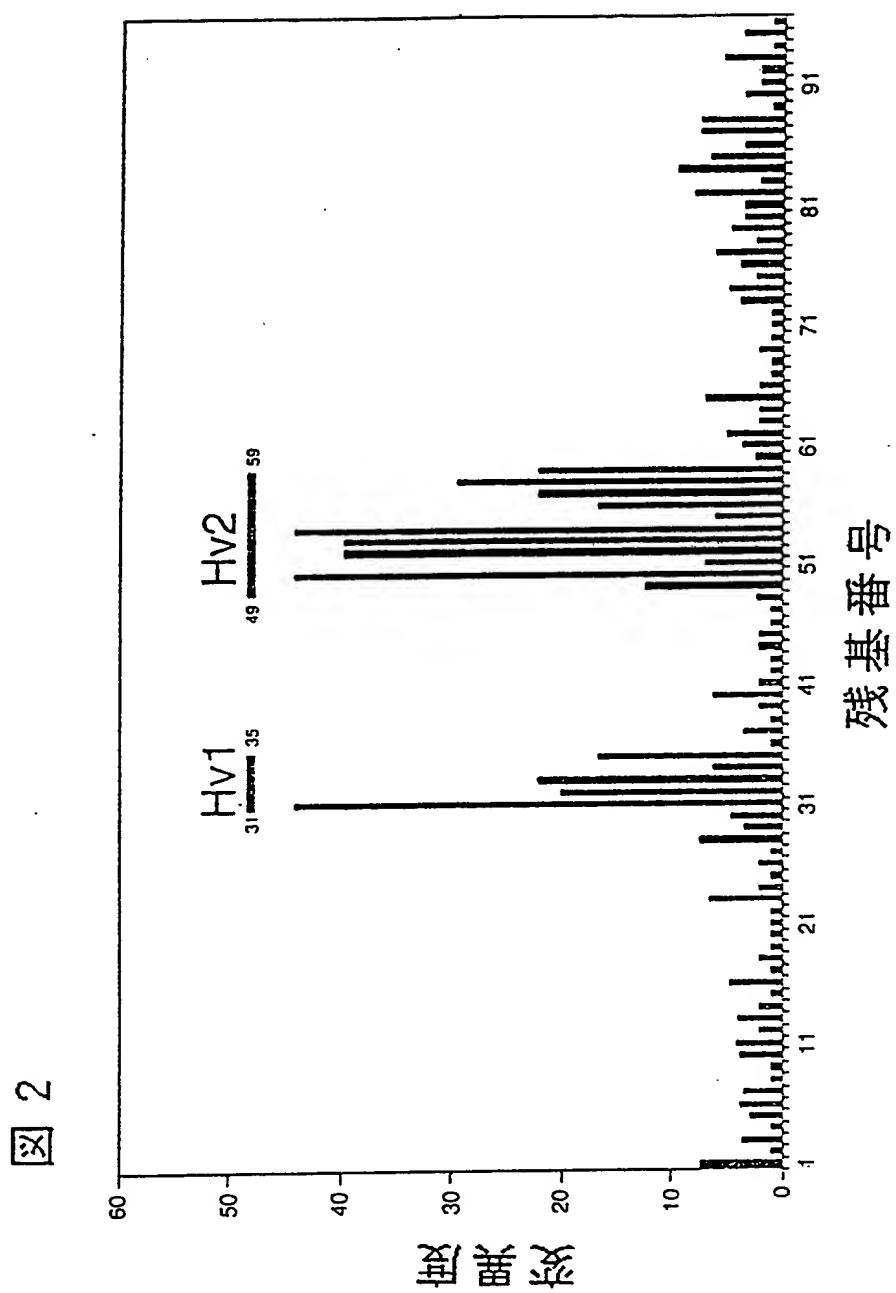
10

15

20

図 1





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00650

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Int. Cl⁵ C12N15/13, C12P21/08</div>														
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; font-size: 0.8em;">Classification System</th> <th style="font-size: 0.8em;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: middle; font-size: 1.2em;">IPC</td> <td style="font-family: monospace; font-size: 1.2em;">C12N15/00, C12P21/08</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: 0.8em; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	IPC	C12N15/00, C12P21/08								
Classification System	Classification Symbols													
IPC	C12N15/00, C12P21/08													
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; font-size: 0.8em;">Category ⁹</th> <th style="font-size: 0.8em;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 15%; font-size: 0.8em;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="font-family: monospace; vertical-align: top;">JP, A, 59-137497 (The Regents of the University of California), August 7, 1984 (07. 08. 84), & EP, A, 109441</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="font-family: monospace; vertical-align: top;">JP, A, 59-135898 (The Regents of the University of California), August 4, 1984 (04. 08. 84), (Family: none)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="font-family: monospace; vertical-align: top;">JP, A, 58-201994 (Hideaki Hagiwara), November 25, 1983 (25. 11. 83), & EP, A, 109441</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-10</td> </tr> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	X	JP, A, 59-137497 (The Regents of the University of California), August 7, 1984 (07. 08. 84), & EP, A, 109441	1-10	X	JP, A, 59-135898 (The Regents of the University of California), August 4, 1984 (04. 08. 84), (Family: none)	1-10	X	JP, A, 58-201994 (Hideaki Hagiwara), November 25, 1983 (25. 11. 83), & EP, A, 109441	1-10
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³												
X	JP, A, 59-137497 (The Regents of the University of California), August 7, 1984 (07. 08. 84), & EP, A, 109441	1-10												
X	JP, A, 59-135898 (The Regents of the University of California), August 4, 1984 (04. 08. 84), (Family: none)	1-10												
X	JP, A, 58-201994 (Hideaki Hagiwara), November 25, 1983 (25. 11. 83), & EP, A, 109441	1-10												
<div style="font-size: 0.8em;"> ¹⁰ Special categories of cited documents: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div> </div>														
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">July 14, 1992 (14. 07. 92)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">August 11, 1992 (11. 08. 92)</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Japanese Patent Office</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">July 14, 1992 (14. 07. 92)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">August 11, 1992 (11. 08. 92)</div>	International Searching Authority <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Japanese Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer								
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">July 14, 1992 (14. 07. 92)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">August 11, 1992 (11. 08. 92)</div>													
International Searching Authority <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Japanese Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer													

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)		
Int. Cl. C12N15/13, C12P21/08		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12N15/00, C12P21/08	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	JP, A, 59-137497 (ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア), 7. 8月. 1984 (07. 08. 84), &EP, A, 109441	1-10
X	JP, A, 59-135898 (ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ ユニバーシティ・オブ・カリフォルニア), 4. 8月. 1984 (04. 08. 84) (ファミリーなし)	1-10
X	JP, A, 58-201994 (萩原 秀昭), 25. 11月. 1983 (25. 11. 83), &EP, A, 109441	1-10
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
14. 07. 92	11.08.92	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 9 1 6 2
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 鷗 飼 健	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.